

**Die Ribonukleinsäure und die
Desoxyribonukleinsäure im
hypertrophen Kaninchenherzen**

Klaus Rey



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0083

AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(Direktor: Prof. Dr. Walter Seitz)

**Die Ribonukleinsäure und die
Desoxyribonukleinsäure im
hypertrophen Kaninchenherzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Klaus Rey
aus Breslau

München
1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. NOWY
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1959

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	7
Eigene Versuche	14
Methodik:	14
1. Die Anlegung einer künstlichen Aorteninsuffizienz bei Kaninchen.	14
2. Sektion und Präparation der Herzen.	15
3. Die Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure der Ribonukleinsäure und der Phosphorproteine.	16
I. Die Beseitigung des säurelöslichen und des Lipoidphosphor.	17
II. Die Behandlung des extrahierten Gewebspulvers mit Alkali und die Auftrennung der Phosphorfraktionen.	18
III. Die Bestimmung des Phosphors.	19
IV. Berechnung.	20
V. Einrichtung der Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung des Phosphors mit Photometer.	21
Ergebnisse	22
1. Erklärung der Tabellen.	22
2. Statistische Analyse der Messergebnisse.	28
Diskussion	33
Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	36
Lebenslauf	39

EINLEITUNG

Wir wissen, welche zentrale Bedeutung den Nukleinsäuren im Leben der Zelle zukommt. Gilt doch eine intravitale Auflösung der nukleoproteidhaltigen Plasmastrukturen als leicht erkennbarer Hinweis auf eine Bedrohung der gesamten Zellstruktur (ALTMANN 1.). In den letzten zwei Jahrzehnten erfahren wir genaueres über die Lokalisation der Nukleinsäuren innerhalb der Zelle, den Ort ihrer Entstehung und über ihre Funktionen.

So gilt heute als gesichert, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNS) ein integrierender Bestandteil aller Chromosomen ist, deren Menge im Zellkern, wie die Anzahl der Chromosomen artcharakteristisch ist (GRUNDMANN 2.). Sie kommt nur im Kern der Zelle und dort nur in den Chromosomen zur Beobachtung. FEULGEN (3.) konnte nachweisen, dass die DNS ihren Sitz vor allem in den Chromomeren des Chromosoms hat. Durch ihre besondere Lokalisation in den Chromosomen kam man schon früh auf den Gedanken, die DNS stelle das biochemische Äquivalent der Gene dar. Entsprechend deren hoher Stabilität zeigt die DNS eine ausserordentliche Beständigkeit im Stoffwechsel. Allein sie erscheint dem dynamischen Gleichgewicht aller Zellinhaltsstoffe entzogen (BUTENANDT 4.), zumindest ist der Abbau gegenüber den anderen Zellsubstanzen ganz erheblich verringert. FURST und BROWN (5.) diskutieren sogar einen DNS-Aufbau, der überhaupt nur während der Mitose eintreten soll, danach bestehe die DNS bis zu dem Tode der Zelle unverändert. Während in der Zelle alles andere im Fluss ist, scheinen die stabilen Gene als ruhende Pole wahrscheinlich allein der materiellen Mause rung nicht unterworfen.

Die Ribonukleinsäure (RNS) entstammt den Chromosomen und sammelt sich innerhalb des Kernes im Nukleolus, der in der Ein- oder Mehrzahl vorhanden ist (ALTMANN 6.), dort liegt sie in der Bindung an niedere Eiweisse vom Histontyp vor (CASPERSON 7.). Die Ribonukleoproteidsubstanzen werden von hier aus nach Bedarf in das Cytoplasma eingeschleust und erscheinen dort vielfach gebunden an submikroskopische Granula, die Mikrosomen. Die RNS findet sich also im Kern der Zelle wie auch im Cytoplasma, im Kern hauptsächlich im Nukleolus angereichert, im Cytoplasma gebunden an besondere Strukturen.

CASPERSON (8.) erkannte, dass jegliche Eiweissbildung im Cytoplasma im Zusammenhang mit Ribonukleotiden stattfindet, während der Chromosomen-

eiweissstoffwechsel im Zusammenhang mit Desoxyribosenukleotiden vor sich geht. Die biologische Bedeutung der Nukleinsäuren liegt also nicht zuletzt in ihrer Fähigkeit zur Eiweissbildung, die ihnen allein zukommt.

Der RNS-Gehalt der Zelle befindet sich anders wie der DNS-Gehalt des Kernes in einem ständigen Fließgleichgewicht. Der Gehalt der Zelle an RNS ist demnach die Resultante aus aufbauenden und abbauenden Vorgängen. Doch sorgt der Kern für die strenge Erhaltung eines bestimmten Niveaus. Ändern sich aber die Stoffwechselbedingungen, so kann entgegen allen Anstrengungen des Kernes dieses Niveau mitverändert werden, das Gleichgewicht ist labil.

So beobachtet man bei Vergiftungen, bei Hunger, bei alimentärem Eiweissmangel, bei Sauerstoff- und Glukosemangel im Blut eine Abnahme des RNS-haltigen basophilen Materials in den Zellen der verschiedensten Gewebe (ALTMANN 1.). Es ist verständlich, dass bei Unterbindung der Energieumsätze, oder bei Fehlen der Ausgangsstoffe für die Neubildung der laufend zugrunde gehenden Plasmastrukturen, alle synthetischen Vorgänge erlöschen müssen. Da der Abbau aber bestehen bleibt, müssen sich die RNS verringern.

Man schreibt den Nukleinsäuren bei der Eiweissbildung eine Art Matritzenfunktion zu. DOUNCE (9.) diskutiert die Möglichkeit, dass Nukleinsäuren als Donatoren von energiereichen Phosphatbindungen dienen, welche eine Knüpfung der Peptidkette ermöglichen sollen. Bei beiden Auffassungen muss mit einem Verbrauch an Nukleinsäuren während der Funktion gerechnet werden, denn auch eine Matritze zerschlägt sich im Gebrauch.

Tatsächlich verringert sich der RNS-Gehalt einer Zelle bei plötzlich erhöhter Belastung. Die Verringerung des RNS-Gehalts der Zelle stellt für den Kern den Reiz zu verstärkter Aktivität dar. Er schwillt an, oft bis auf das Dreifache seiner Normalgrösse, die Chromosomen entfalten sich, die Anzahl der Nukleolen nimmt zu (6. und 2.). Hat die Zelle einen länger anhaltenden erhöhten Eiweissumsatz zu bewältigen, so wird das ganze am Eiweissstoffwechsel des Cytoplasmas beteiligte System des Zellkerns gewissermassen auf ein erhöhtes Niveau gehoben, das so lange erhalten bleibt, wie von der Zelle die gesteigerte Leistung gefordert wird.

Es scheint aber, als wären damit die Reaktionsmöglichkeiten des Kernes auf eine längere und stärkere Belastung noch nicht erschöpft. Das zeigt sich besonders, wenn sich in der Zelle und auf deren Kosten Viren, Protozoen oder andere Mikroorganismen vermehren. Denn dann beobachtet man häufig, so-

fern der betreffende Kern dazu überhaupt noch in der Lage ist, eine intranukleäre Erhöhung der Chromosomenzahl, die sich unter dem Bilde der Endomitose (GEITLER) vollzieht, also durch eine Chromosomenspaltung innerhalb des Zellkerns ohne Auflösung der Kernmembran (6.).

Auch an menschlichen Geweben konnten Endomitosen nachgewiesen werden als Anpassung an eine Mehrbelastung der Zelle. Der Kern wie auch die Zelle als Ganzes wachsen dabei in der Regel an. Wie wir oben sahen, kann eine Vergrößerung des Kernes durchaus ohne Vermehrung der Chromosomensätze einhergehen, doch sind nach BÜCHNER (3.) alle Riesenkernbildungen der Pathologie auf eine endomitotische Polyploidie zumindest verdächtig.

In diesem kurzen Überblick über die allgemeine Bedeutung der Nukleinsäuren sei der Stoff geliefert für unsere spätere Betrachtung, nämlich des speziellen Problems der Nukleinsäuren im hypertrophen Herzen. Bevor wir dazu übergehen, müssen wir zuerst auseinanderlegen, was unter Herzhypertrophie zu verstehen ist.

Auf eine chronische Mehrbelastung des Herzens, wie sie bei Leistungssportlern und Schwerarbeitern und krankhafter Weise bei Klappenfehlern oder Hochdruckkrankheiten zur Beobachtung kommt, antwortet das Organ mit einer Vermehrung seiner Muskelmasse, mit Hypertrophie, die gewichtsmäßig zur Verdoppelung ja Verdreifachung des normalen Herzgewichtes führen kann. Doch bei diesen letztgenannten extrem vergrößerten Herzen zeigen sich schon deutlich strukturelle Veränderungen und Parenchymschäden. LINZBACH (10.) schied deshalb zwischen einer physiologischen Herzhypertrophie, die im Zellbild noch keine krankhaften Veränderungen zeigt, und einer pathologischen und führte den Begriff des kritischen Herzgewichtes, welches beim menschlichen Erwachsenenherzen bei 500 g liegt, ein. Das normale Herzgewicht wird mit etwa 300 g angegeben, also führt erst eine über 65 %ige Gewichtszunahme zu morphologisch sichtbaren Schäden. Es sind nur krankhafte Bedingungen, welche das Herz primär und pausenlos beeinflussen, wie Hypertonus und Klappenfehler, die zu Anpassungswachstum des Herzens weit über das kritische Herzgewicht führen. Doch auch hier wird anfänglich die Phase der physiologischen Herzhypertrophie durchschritten.

Für diese gilt (LINZBACH 11.), dass sie ohne wesentliche Faservermehrung verläuft, die Anzahl der Zellkerne bleibt konstant, es werden die spezifischen Elemente des Organs lediglich vergrößert. Das Gefäßsystem erweitert sich zwar, wenn auch begrenzt, aber es vermehrt nicht seine Kapillaren.

Die relative Oberflächenverkleinerung und die Dickenzunahme der einzelnen Herzmuskelfaser muss zwangsläufig die Diffusion zur Zellmitte erschweren, da ausserdem die Anzahl der Kapillaren unverändert bleibt, muss die Ernährung der Zellen von einer gewissen Grösse ab in Schwierigkeiten geraten. Doch bei Wachstum bis zum kritischen Herzgewicht werden noch keine Störungen im Stoffaustausch beobachtet, wenn nicht andere Ursachen eine direkte Schädigung des Herzmuskels auslösen, etwa ein Infarkt oder eine Myocarditis. Man könnte somit innerhalb der physiologischen Herzhypertrophie eine ideale Anpassung des Herzmuskels an erhöhte Leistungsanforderungen sehen.

Wird jedoch durch weiteres Wachstum die kritische Grenze überschritten, so stellen sich sehr bald durch insuffizientwerden des Stoffaustausches zwischen Zelle und Kapillare Parenchymschäden ein mit den Symptomen der Herzinsuffizienz.

Es gibt aber auch Fälle, wo vermutlich die latente Coronarinsuffizienz den Reiz darstellt, die Faserzahl zu vermehren. LINZBACH beobachtete eine Vermehrung der Muskelfasern durch Längsspaltung auf fast die doppelte Anzahl mit einer entsprechenden Vermehrung der Herzmuskelkerne und wird hierin von NIETH (12.) bestätigt. Es scheint sich in diesen Fällen sogar die Zahl der Kapillaren zu vermehren. Es liegt hier eine echte numerische Hyperplasie vor. LINZBACH nennt diese Art des Herzwachstums jenseits des kritischen Herzgewichts eine konzentrische Hypertrophie, weil hier das Herz infolge der noch guten Leistungsfähigkeit nicht dilatiert.

Diese Regulation ist eine glückliche Verzögerung der drohenden Insuffizienz, doch ist sie auch hier nicht aufzuhalten. Es haben die Hypertrophie auslösenden Krankheiten die Tendenz fortzuschreiten, andererseits tritt das hypertrophische Herz auch bei dem günstigen konzentrischen Wachstum mit seinem Blutbedarf, der für das normale Herz schon 10 % des Schlagvolumens ausmacht, mehr und mehr in Konkurrenz mit dem Bedarf anderer Organe. So muss es zu gelegentlichen lokalen Durchblutungsstörungen im Herzen kommen und in deren Gefolge zu Zellschädigungen und Nekrosen.

Bei unseren Untersuchungen interessierte uns vor allem das voll kompensierte, gutartig hypertrophische Herz, das nach Auffassung von LINZBACH auf dem Wege eines harmonischen Wachstums aller Zellteile entsteht. Die Dimensionen vergrössern sich, doch entsprechen die Elementarstrukturen ganz den normalen Verhältnissen.

Es gibt nur wenige Erfahrungen über das Verhalten der Nukleinsäuren im Herzen und gar keine über das Verhalten im hypertrophen Herzen. Die Erkenntnisse über die Nukleinsäuren wurden an anderen Organen und Tieren der verschiedensten Gattungen, ja an Pflanzen erschlossen. Doch ist ihr paradigmatischer Charakter durchaus anzunehmen.

Bei organvergleichenden Untersuchungen erscheinen hier und da auch Angaben über den Gehalt des Herzens an Nukleinsäuren. So bei DAVIDSON und WAYMOUTH (13.), sie verglichen den Nukleinsäuregehalt erwachsener zu embryonalen Geweben. Pro 100 g Frischgewebe finden sie einen Nukleinsäure-Phosphor-Gehalt von 29 mg bei Herzen des erwachsenen Schafes und für den Embryo 64 mg, bei Hühnern, für erwachsene Herzen 32 mg für embryonale Herzen 75 mg. Diese Verhältnisse verwundern uns nicht, in embryonalen Herzen finden noch viele Mitosen statt, die Zellen sind kleiner, daher sind in der Gewichtseinheit auch mehrere anzutreffen und ausserdem ist der Eiweisstoffwechsel, damit der RNS-Gehalt, durch die Wachstumsvorgänge als gesteigert anzunehmen. Sie finden eine Relation zwischen RNS- zu DNS-Gehalt bei Embryoherzen (Schaf) von 2,4 und bei erwachsenen Herzen von 3,6. Im Embryoherzen werden viele Zellen kurz vor der mitotischen Teilung angetroffen, in ihnen ist die Chromosomenzahl verdoppelt und damit der DNS-Gehalt. Dies erklärt die niedere Relation für embryonale Gewebe.

THOMSON und Mitarbeiter (14.) untersuchten den DNS-Gehalt des isolierten Einzelkernes und fanden den DNS-Gehalt pro Kern in den verschiedensten Organen einer Tierart nur in engen Grenzen variierend. Nur in Organen mit Polyploidie lag er höher. Für das normale Herz scheint diese ausgeschlossen. Der DNS-Gehalt pro Kern liegt auf gleicher Ebene mit dem vieler anderer Organe, bei denen bisher ebenfalls keine Polyploidie nachgewiesen werden konnte.

BANGA und Mitarbeiter (15.) unterwarfen Ratten einem bis zu 25-tägigem Schwimmtraining, einzelne Gruppen wurden während dieser Zeit mit ATP, mit Corhormon und einem weiter gereinigtem Extrakt aus Embryonalherzen, genannt Guanylsäurederivat, behandelt. In den Herzen wurde die Gesamtnukleinsäure bestimmt. Unter den ruhenden Kontrolltieren ergaben sich bei behandelten und unbehandelten Tieren keine Unterschiede. Im Training ist jedoch ein erheblicher Abfall des Nukleinsäure-Phosphors von 38 mg pro 100 g Frischgewebe bis auf 21 mg bei den unbehandelten Tieren zu verzeichnen. Bei mit Corhormon behandelten Tieren ist er geringer und bei mit ATP

oder Guanylsäurederivat behandelten bleibt er auf gleichem Niveau. Aus diesen Untersuchungen ist nicht ersichtlich auf welches Konto der Nukleinsäureverlust geht und ob nicht bei den behandelten Tieren Verschiebungen in den Nukleinsäurefraktionen sich hinter einer scheinbaren Konstanz der Gesamtnukleinsäure verbergen. Nach den eingangs geführten Erörterungen ist jedoch anzunehmen, dass in der ausserordentlichen Beanspruchung des eiweissbildenden Apparates während des Trainings infolge der gesteigerten Strukturabnutzung, der RNS-bildende Apparat der Chromosomen mit der vermehrten Abnutzung von RNS nicht mehr Schritt halten kann, also geht der Verlust an Nukleinsäuren wahrscheinlich auf Kosten der RNS. Man sieht aus den Versuchen von BANGA und Mitarbeitern weiter, dass es möglich ist, diese sich anscheinend gesetzmässig vollziehenden Veränderungen zu beeinflussen. Die unbehandelten Tiere zeigten gegenüber den behandelten einen starken Leistungsabfall, demnach dürfte der Erhalt des normalen Nukleinsäuregehaltes der Zelle für diese von entscheidender Bedeutung sein. Die Erschöpfung der RNS würde nach unserer heutigen Anschauung die Eiweissbildung der Zelle zum Erliegen bringen und damit die Strukturerhaltung, die Nekrose wäre die unmittelbare Folge.

Es lassen sich also die am Herzen gemachten Erfahrungen durchaus in das allgemeine Bild über die Nukleinsäuren einfügen. Bei einer so regelmässigen in der Zelle auftretenden Substanz ist auch eine einheitliche Funktion zu erwarten.

Welchen Einfluss hat nun die Hypertrophie auf den Gehalt der Zelle an Nukleinsäuren? Hierüber ist bisher nichts bekannt.

Wir hörten, dass man während des hypertrophischen Wachstums eine erste gutartige Phase unterscheiden kann, es treten morphologisch keine Schädigungen in die Erscheinung. Man ist geneigt dieses Wachstum harmonisch zu nennen, da jede Struktur wohl abgewogen gegen die andere sich vergrössert, nichts Entartetes lässt sich finden. Wird der Kern ohne endomitotische Vermehrung seiner DNS d.h. seiner Chromosomensätze, den nun auch vergrösserten Bedarf der vergrösserten Zelle an RNS bewältigen können?

Käme es zu keiner Endomitose - Mitosen scheinen sowieso ausgeschlossen - müsste der Gesamtgehalt des Herzens an DNS konstant bleiben, daher müsste man mit verstärkter Hypertrophie auch einen verstärkten Rückgang von DNS in der bestimmten Gewichtsmenge beobachten, die Relation von RNS zu DNS müsste anwachsen, vorausgesetzt der RNS-Gehalt bliebe in der Gewichtseinheit gleich, d.h. die RNS vermehre den Gesamtgehalt des Herzens entspre-

chend dem Gewichtsanstieg. Doch wir müssen mit Endomitosen bei allen Riesenkernbildungen rechnen (s. S. 9). In diesem Falle können wir durchaus normale Relationen von RNS zu DNS finden, beide Säuren verdoppeln ihre Menge in der Zelle. Auch die Ergebnisse pro Gewichtseinheit könnten dem Normalen entsprechen. In diesem Falle wäre auch im Bezug auf die Nukleinsäuren von harmonischem Wachstum zu sprechen, obwohl ja die DNS sich niemals kontinuierlich vermehrt, sondern immer nur während der Mitose ihren Bestand sprunghaft verdoppelt. Da aber unsere Untersuchungstechnik eine bestimmte Summe von Zellen in den Blick nimmt, werden sich die Konturen verwischen. Denn eine Zelle mag sich bereits endomitotisch verbessert haben, für andere war dieser Weg noch nicht nötig und hier wäre die Relation noch höher. Bei anderen tetraploiden Zellen könnte der Gehalt an RNS mehr als verdoppelt werden, so resultiert im Gesamten ein dem Normalen ähnliches Bild.

Bleibt der Stoffaustausch der Zelle ungestört, dies ist während der gutartigen Hypertrophie anzunehmen, so müssten wir für den RNS-Gehalt der Zelle einen Anstieg erwarten. Der Eiweissbedarf des vergrößerten und stärker belasteten Organs ist gestiegen. Die Relation hinge vom Verhalten des Kernes ab, bei Endomitose - normal, bis erhöht - ohne Endomitose - stärkere Erhöhung, wenn der nukleäre RNS-bildende Apparat voll suffizient ist. Nur bei Insuffizienz dieses Apparates oder bei mangelndem Stoffaustausch wäre mit einer Abnahme von RNS zu rechnen.

Diese Fragen einer Klärung näher zu bringen war der Grund unserer Bemühungen.

EIGENE VERSUCHE

Wir bedinten uns bei unseren Untersuchungen folgender Technik: Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe von 12 erwachsenen Kaninchenböcken blieb unbehandelt und wurde als normale Vergleichstiere geschlachtet.

Der zweiten Gruppe von 9 Kaninchenböcken wurde operativ etwa 6 Monate vor der Sektion eine künstliche Aorteninsuffizienz beigelegt. Bis zur Sektion bildete sich eine Herzhypertrophie aus.

Bei der Bestimmung der Nukleinsäuren bedienten wir uns des Verfahrens von THANNHAUSER.

Die Methodik wird im Folgenden genau beschrieben.

METHODIK

1. Die Anlegung einer künstlichen Aorteninsuffizienz bei Kaninchen⁺⁾

Zur Operation gelangten durchwegs gesunde, junge männliche Tiere. Sie wurden gewogen und durch i. v. Injektion von 10 ccm einer 20 %igen Urethanlösung betäubt. Meist war während der Operation noch eine zusätzliche Äthernarkose nötig.

Vor dem Beginn einer jeden Operation wurde ein Kontroll-EKG abgeleitet. Die vordere Halspartie wurde bis zum Brustbein rasiert und desinfiziert. Unter sterilen Kautelen wurde die rechte Carotis aufgesucht und in einer Länge von ca. 2 cm freipräpariert. Zwei Haltefäden wurden angelegt, die der späteren Unterbindung des Gefäßes dienten, sowie der caudale zusätzlich der Abdichtung des Gefäßes gegen den eingeführten Perforator. Dieser besteht aus einer ca. 15 cm langen und 2 mm breiten Kanüle, die an ihrem distalen Ende gezahnt ist. Die scharfen Spitzen werden durch einen eingeführten Mandrin überragt und werden auf diese Weise unschädlich gemacht. Im Abstand von etwa 2 cm wurden zwei Klemmen an das Gefäß gesetzt, zwischen ihnen wurde der Perforator durch einen feinen Einschnitt in das Gefäß eingeführt. Die beiden Haltefäden wurden nun angezogen und garantier-

⁺⁾ Die Operationen, Druckmessungen und Isolierung der Herzen wurden von Dr. H. NOWY und Dr. H. D. FRINGS ausgeführt.

ten somit die Abdichtung, danach konnten die Klemmen wieder entfernt werden. Der Perforator wurde nun samt Mandrin herzwärts vorgeschoben bis der Klappenwiderstand fühlbar wurde, der Mandrin wurde nun etwa 1 cm zurückgezogen und die Klappe mit der jetzt scharfen Spitze des Instrumentes durchtrennt.

Vor der Perforation wurde der Druck in der Carotis mit einem elektrischen Druckelement (Statham) gemessen und registriert, nach der Perforation im linken Ventrikel und, die Kanüle zurückziehend, wieder in der Aorta bzw. in der Carotis. Auf diese Weise hatten wir einen Anhaltspunkt, ob wir tatsächlich einen ausreichenden Herzfehler gesetzt hatten. Sein Ausmass liess sich am diastolischen Druckabfall gut schätzen.

Die Kanüle konnte nun entfernt und das Gefäss zweifach ligiert werden. Durch den Ausfall der rechten Carotis bedingte Störungen wurden praktisch nicht beobachtet. Die Wunde wurde in Fascien- und Hautnaht verschlossen.

Prophylaktisch bekamen die frisch operierten Tiere bis zu 5 Tage nach der Operation täglich 50.000 E Penicillin gespritzt. Sie erholten sich meistens sehr schnell. Die Operationssterblichkeit war fast gleich Null. Hatte man allerdings mehr als eine der Aortenklappen verletzt, so dass neben dem diastolischen auch der systolische Druckabfall in der Carotis nach der Operation zu gross wurde, starben die Tiere in kurzer Zeit.

Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelställen untergebracht und bekamen alle einheitlich normale Kost.

2. Sektion und Präparation der Herzen

Ungefähr 6 Monate nach der Operation wurden die Tiere gewogen und anschliessend seziert. Vor der Tötung in Urethannarkose wurde noch einmal ein EKG und zusätzlich in einzelnen Fällen ein Phonokardiogramm abgenommen, ausserdem wurde der Druck jetzt in der linken Carotis mittels einer eingestochenen Kanüle direkt gemessen. Das Herz wurde danach dem Brustkorb entnommen.

Um das Herz auch von Blutresten in dem Coronarkreislauf zu befreien, welches vor allem für die parallel laufenden Elektrophorese-Untersuchungen von Bedeutung war, wurde dasselbe sofort mit Tyrode-Lösung, die 0,5 Glukose enthielt, bei einer Temperatur von 30 Grad Celsius (abkühlend) durchspült. Zu diesem Zweck wurde das ruhig weiterschlagende Herz in die eben beschriebene Lösung getaucht und ausserdem schlossen wir mit Hilfe einer Glas-

kanüle die Aorta an ein Druckgefäß mit der gleichen Lösung an. Schon nach wenigen Schlägen sah man die oberflächlich liegenden Coronargefäße farblos werden.

Das Herz wurde nun abgetrocknet und auf mit Filterpapier abgedeckten Seesand gelegt und anschliessend mit einer grossen Zahl von in flüssigem Stickstoff gekühlten Stahlnadeln durchbohrt. Dann wurde das Herz in flüssigen Stickstoff getaucht und erstarrte so vollständig. Nachher wurde das Herz wieder von den Nadeln gelöst und bis zur Weiterverarbeitung auf Trockeneis gelegt.

Diese Prozedur hat den Zweck, das Herz möglichst rasch und möglichst tief zu unterkühlen um plötzlich alle Lebensvorgänge zu unterbrechen, vor allem autolytische Vorgänge post mortem zu verhindern.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Herz vollständig von Fett- und Bindegewebe befreit und dabei nur soweit erwärmt, dass es sich gerade schneiden liess. Dann wurde das Gesamtherz, die Vorhöfe und die beiden Ventrikel gewogen.

3. Die Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure der Ribonukleinsäure und der Phosphorproteine (Methode nach G. SCHMIDT und S.J. THANNHAUSER (16.), für unsere Versuche gering modifiziert)

Das Verfahren nach THANNHAUSER bedient sich des Gehalts der Nukleinsäure an Phosphor. In einem ersten Arbeitsgang werden deshalb alle anderen phosphorhaltigen Substanzen mit Ausnahme der Phosphorproteine von den Nukleinsäuren abgetrennt, dies sind der säurelösliche und der Lipoid-Phosphor. Danach werden die Phosphorfractionen der DNS und der RNS aufgetrennt, dies wird erreicht durch selektive Destruktion der RNS unter dem Einfluss einer Behandlung mit schwacher Alkali, die RNS wird quantitativ in säurelösliche Nukleotide gespalten, während die DNS ihre Säureunlöslichkeit beibehält. Die Phosphorgruppen der Phosphorproteine werden quantitativ freigesetzt und erscheinen als anorganisches Phosphat in Lösung.

Wenn nun eine Mischung von RNS, DNS und von Phosphorproteinen mit verdünnter Alkali behandelt und darauf mit einer starken Säure gefällt wird, so ist der Gesamtphosphor des Niederschlags derjenige der DNS, der organische Phosphor des Filtrats gehört den Phosphorproteinen an.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Die Beseitigung des säurelöslichen und des Lipoidphosphor

Reagentien: physiologische Kochsalzlösung (eiskalt)

20 %ige Trichloressigsäure "

2 %ige Trichloressigsäure "

Aqua bidest "

Bloorsche Lösung (Spiritus Benzin vergällt + Äther 3 : 1)

Äther p. a.

Chloroform + Methanol 1 : 1 p. a.

In gefrorenem Zustand werden 2 mal annähernd 600 mg Herzmuskelgewebe aus dem linken Ventrikel analytisch gewägt. (Die Bestimmung wurde grundsätzlich im Doppelversuch vorgenommen, im weiteren braucht darauf nicht erneut hingewiesen zu werden). Das Gewebe wird grob mit einer Schere zerkleinert und in 8 ccm einer physiologischen Kochsalzlösung suspendiert und unter Eiskühlung in der Potter-Mühle 8 Min. homogenisiert. Das Homogenat wird quantitativ in 50 ccm Zentrifugengläser gegeben. 7,5 ccm geeiste physiologische Kochsalzlösung dienen dem fraktionierten Spülen der Potter-Mühle. Unter Umrühren mit einem Glasstab wird das Homogenat mit 9,4 ccm einer 20 %igen eiskalten Trichloressigsäure (TES) gefällt. So entsteht eine Säurekonzentration von etwa 7 - 8 %. Die Suspension wird etwa 30 Minuten im Eisbad belassen unter ständigem Aufrühren. Zur Abtrennung des Niederschlags benutzen wir die Zentrifuge, da wir mit Filtern zu grosse Verunreinigungen (Silikate) in den Versuch bringen.

Die Suspension wird also etwa 10 min bei 2.000 g zentrifugiert, das Zentrifugat wird mittels Absaugkapillare abgehoben. Der zurückbleibende Niederschlag wird nun zweimal mit etwa 45 ccm einer eiskalten 2 %igen TES gewaschen - aufgewirbelt, wieder 10 min zentrifugiert und Zentrifugat abgesaugt. Darauf wird zweimal mit eiskaltem Aqua bidest in der gleichen Weise gewaschen, die Reaktion gegen Lakmus wird neutral. Zuletzt wird gewaschen mit Bloorscher Lösung und darauf mit Äther p. a. je einmal. Hier können die Zeiten zum Zentrifugieren auf etwa 5 min abgekürzt werden. Der Rückstand trocknet vollkommen aus und lässt sich leicht im ganzen in Schliffkolben übertragen. Mit etwa 40 ccm Bloorscher Lösung werden die Reste nachgespült. Die Suspension wird nun unter dem Rückflusskühler 5 min gekocht. Danach wird die Flüssigkeit in dasselbe Zentrifugenglas von oben abgegossen und 7 min zentrifugiert, das Zentrifugat wird abgehoben. Die ausgefallenen

Substanzteile werden mit Hilfe von etwa 40 ccm einer 1 : 1 Chloroform-Methanol-Lösung in den Kolben zurückgespült und 30 min unter dem Rückflusskühler gekocht. Der Rückstand gelangt quantitativ wieder in dasselbe Zentrifugenglas und wird zentrifugiert. Das Zentrifugat wird abgehoben und der Rückstand mit Äther p. a. gewaschen. Zuletzt bleibt ein Rest vollständig trockenen Pulvers zurück. Das jeweils abgehobene Zentrifugat wurde verworfen. Das Pulver wird in Petrischalen über Nacht in den Exsiccator gestellt.

II. Die Behandlung des extrahierten Gewebepulvers mit Alkali und die Auftrennung der Phosphorfraktionen

Reagentien: 1 n NaOH
 6 n HCL
 5 %ige TES (eiskalt)
 2 %ige TES "
 konz. Ammoniak
 Phenolphthalein
 2,5 %ige Calciumchloridlösung
 0,5 %ige Magnesiumcarbonatsuspension
 2 %ige Ammoniaklösung mit CaOH gesättigt
 Aqua bidest

Das Pulver wird quantitativ in 15 ccm Zentrifugengläser übertragen, mit genau 6 ccm einer 1 n NaOH versetzt, dann wird das Glas mit einem Gummistopfen verschlossen und für 18 Stunden bei 37 Grad C inkubiert. Unter diesen Bedingungen löst sich das Pulver fast vollständig auf. Nach der Inkubation wird die Lösung kräftig geschüttelt und darauf 10 min zentrifugiert.

Der Gesamtphosphor wird in 1 ccm des Zentrifugates nach C.H. FISKE und Y. SUBBAROW (17. und 18.) bestimmt.

Zur Trennung des säurelöslichen und anorganischen Phosphors vom säureunlöslichen Phosphor werden weitere 3 ccm abpipettiert und in ein 15 ccm Zentrifugenglas gebracht, unter Hinzufügung von 0,6 ccm einer 6 n HCL und 3 ccm einer 5 %igen TES (eiskalt) wird die DNS ausgefällt. Der Phosphorgehalt des Hydrolyisationsproduktes der RNS und der Phosphorgehalt der Phosphoproteine verbleibt im Filtrat. 30 min wird die Suspension unter wiederholtem Aufwirbeln stehengelassen. Danach wird zentrifugiert und 2 ccm des Filtrats werden abgehoben zur Phosphorbestimmung nach C.H. FISKE und Y. SUBBAROW. 4 ccm des Filtrats werden zur Fällung des anorganischen Phosphors

nach G.E. DELORY (19.) in ein 15 ccm Zentrifugenglas abpipettiert. (Die Methode von G.E. DELORY ist nur geringfügig von der Originalanweisung abgewandelt). Unter tropfenweiser Zugabe von konz. Ammoniaklösung wird gegen Phenolphthalein neutralisiert, im Überschuss werden noch weitere 0,2 ccm hinzugegeben. Nach Zugabe von 1 ccm einer 2,5 %igen Calciumchloridlösung und von 1 ccm einer 0,5 %igen Magnesiumcarbonat-Suspension in Wasser, wird mit dem Glasstab umgerührt und 30 min abgewartet unter gelegentlichem Aufwirbeln der Suspension. Danach wird zentrifugiert, das Zentrifugat wird sorgfältig abgehoben und verworfen. Der Niederschlag wird mit 5 ccm einer 2 %igen Ammoniaklösung, die mit CaOH gesättigt ist, gewaschen. Es wird wieder zentrifugiert und das Überstehende quantitativ abgehoben. Der getrocknete Niederschlag wird in 5 ccm einer 5 %igen TES gelöst. 4 ccm gelangen nun in ein feuerfestes Reagenzglas zur Phosphorbestimmung nach C.H. FISKE und Y. SUBBAROW. Der Niederschlag der DNS aus der Säurefällung des Hydrolysates wird zweimal mit eiskalter 2 %iger TES gewaschen und danach quantitativ mit Hilfe von geringen Mengen Aqua bidest in ein feuerfestes Reagenzglas übertragen zur Bestimmung des Phosphorgehaltes nach C.H. FISKE und Y. SUBBAROW.

III. Die Bestimmung des Phosphors

nach C.H. FISKE und Y. SUBBAROW (17. und 18.) (gering modifiziert)

Reagentien: 1 n HCL

Phenolphthalein

5 n H_2SO_4 p. a.

10 %iges H_2O_2 p. a.

2,5 %ige Ammoniummolybdatlösung

Aqua bidest

Reduktionsmittel: Natrium bisulfit	30,0 g
------------------------------------	--------

Natrium sulfit anhyd.	6,0 g
-----------------------	-------

1 Amino 2 Naphtol 4 Sulfons.	0,5 g
------------------------------	-------

Aqua bidest ad 250,0 ccm	
--------------------------	--

Die genau abgemessenen Mengen der einzelnen Phosphor-Fractionen gelangen in feuerfeste Reagenzgläser. Die Fraction des alkalischen Hydrolysates wird gegen Phenolphthalein mit einer 1 n HCL neutralisiert. Nun werden alle Fractionen in der gleichen Weise wie folgt behandelt. Zunächst wird das Wasser bis auf etwa 1 - 1/2 ccm verdampft. Bei grosser Bunsenflamme wird bis zum Kochen erhitzt, danach nur mit kleiner Flamme der Boden des Glases, um Verdampfungsverluste zu vermeiden, die besonders bei Überhitzung

des Meniskusrandes entstehen können. Danach werden 2,5 ccm einer 5 n H_2SO_4 hinzugefügt. Über der Bunsenflamme wird wieder bis zum Kochen erhitzt, danach bei kleiner nur noch der Boden des Glases. Sobald Dämpfe erscheinen, muss die Flamme weiter reduziert werden, so dass die Flüssigkeit gerade eben am Kochen erhalten bleibt. Die Veraschung ist vollständig, wenn keine weitere Schwärzung mehr auftritt und die Schlieren im Glas hoch hinaufsteigen. Nach Abkühlen des Glases wird jetzt 10 %ige H_2O_2 tropfenweise hinzugefügt und in der gleichen Weise wieder erhitzt, nie werden mehr als 2 - 3 Tropfen auf einmal zugegeben. So verfährt man bis sich vollständige Farblosigkeit einstellt.

Nachdem sich das Glas abgekühlt hat, werden 2,5 ccm einer 2,5 %igen Ammoniummolybdatlösung hinzugefügt, darauf 21 ccm Aqua bidest und zuletzt 1 ccm des Reduktionsmittels, dabei entsteht die typische Blaufärbung. Mit einem Glasstab wird gut vermischt und nach 10 min wird im Eppendorf Photometer der Extinktionswert abgelesen. Zur Ablesung benutzen wir das Filter 578 und 10 mm Glasküvetten. Aus folgenden Reagentien stellten wir uns zu jedem Versuch eine Vergleichslösung her: 2,5 ccm 5n H_2SO_4 + 2,5 ccm 2,5 %ige Ammoniummolybdatlösung + 19 ccm Aqua bidest + 1 ccm Reduktionsmittel. Das verascht und oxydierte Material ergab eine Menge von 0,5 ccm, unter Hinzufügung der oben genannten Reagentien erhalten wir eine Gesamtlösungsmenge von 25 ccm, wie auch in unserer Vergleichslösung.

IV. Berechnung:

Die Differenz zwischen dem Gesamtphosphor des alkalischen Hydrolysates (T1) und dem Gesamtphosphor des Zentrifugates aus der Säurelösung (T2) bestimmt den Phosphorgehalt der DNS. Die Differenz zwischen T2 und dem anorganischen Phosphor ergibt den Phosphorgehalt der RNS.

Der anorganische Phosphor gehört den Phosphorproteinen an. Der Phosphorgehalt des Niederschlags der DNS dient nur zur Kontrolle des aus der Differenz berechneten DNS-P.

Für unser Photometer wurde eine Phosphor-Eichkurve hergestellt, jeder Phosphormenge entspricht ein bestimmter Extinktionswert. Wir können so mit unseren gefundenen Extinktionswerten den entsprechenden Phosphorgehalt aus dieser Kurve ablesen. Wir hätten damit den Phosphorgehalt der in die Reagenzgläser einpipettierten Mengen bestimmt. Diese entsprechen einem bestimmten, je nach Höhe des eingewogenen Gewebegewichtes variierendem Gewicht an Frischgewebe. Von diesem immer neu zu berechnendem Gewicht

wird auf 100 g umgerechnet. Auf dieser Basis werden die mg-Werte Phosphor pro 100 g Frischgewebe nach dem oben genannten Schema für den Gesamtphosphor, den anorganischen Phosphor, für die DNS und die RNS errechnet. Von der DNS gehen uns zwei Werte zu, da wir einen zusätzlichen Kontrollwert aus der Direktbestimmung erhalten.

V. Einrichtung der Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung des Phosphors mit Photometer

Von einer Standardlösung, die 2,0 mg Phosphor in 100 ccm H_2O = 0,02 mg pro 1 ccm enthält, wird analog der Phosphorbestimmung in fortlaufend nummerierte 25 ccm Messkolben 1 - 10 ccm Lösung pipettiert. Dieser Lösung werden je 2,5 ccm 5 n H_2SO_4 und 2,5 ccm einer 2,5 %igen Ammoniummolybdatlösung und 1 ccm Reduktionsmittel zugegeben und auf 25 ccm mit Aqua bidest aufgefüllt. Nach kurzem Stehen wird geschüttelt und dann im Photometer die Extinktion der Farbintensität gemessen. Als Vergleichswert dient eine Lösung der eben verwendeten Reagentien (2,5 ccm 5 n H_2SO_4 + 2,5 ccm 2,5 %ige Ammoniummolybdatlösung + 1 ccm Reduktionsmittel + Aqua bidest ad 25 ccm), es wird das Filter 578 verwendet.

Glas	1	enthält	1 ccm	Lösung	= 0,02 mg P	Extinkt.	= 0,085
"	2	"	2	"	"	"	= 0,152
"	3	"	3	"	"	"	= 0,219
"	4	"	5	"	"	"	= 0,345
"	5	"	10	"	"	"	= 0,659

Die erhaltenen Extinktionswerte werden auf Millimeterpapier eingetragen und untereinander verbunden. Da wir für unsere Zwecke nur den unteren Anteil der Kurve brauchen, schreiben wir diesen neu in dem uns günstigen Massstab.

ERGEBNISSE

Wir stellten unsere Versuchsergebnisse in 4 Tabellen zusammen, im Folgenden werden sie der Reihe nach erläutert.

In Tabelle 1 sind die Tiergewichte, Herzgewichte, die Verhältniszahlen von Herzgewicht (g) zu Tiergewicht (kg), die Ventrikelgewichte (links + rechts) und die Druckamplituden in mm Hg von den 12 von uns untersuchten gesunden, unbehandelten Kaninchenböcken, den Normaltieren, zusammengestellt.

Tabelle 1 (Normaltiere)

Tier Nr.	Tiergew. g	Herzgew. g	$\frac{\text{Herzgew.g}}{\text{Tiergew.kg}}$	Ventrikelgew. g	Druckampl. mm Hg.
1	3770	9,80	2,60	7,60	
2	4100	9,00	2,19	7,60	
3	3900	8,15	2,09	6,70	
4	2800	7,45	2,66	6,50	
5	2600	8,70	3,34	7,50	
6	3790	9,57	2,52	7,55	
7	2610	5,65	2,16	4,67	
8	3150	6,49	2,06	5,22	
9	3300	9,24	2,79	7,10	
10	3000	6,22	2,07	4,60	
11	3050	5,94	1,94	5,49	
12	4550	10,16	2,23	8,88	
	3385	8,03	2,38	6,61	23

Ein Anwachsen der Verhältniszahl von Herzgewicht zu Tiergewicht wird als Ausdruck einer Herzhypertrophie angegeben, wir versuchten das Gleiche zu zeigen.

Zur Angabe der Druckamplitude muss bemerkt werden, dass sie der Mittelwert aller von uns gemessenen Normaltiere ist. An den hier untersuchten Tieren wurde der Blutdruck nicht gemessen. Zweitens ist die Druckamplitude kein absolutes Mass, da sie bei Unterbindung der rechten Carotis in der Aorta gemessen wurde, sie dient uns lediglich zum Vergleich zur Druckamplitude bei

Tabelle 2 (Tiere mit Herzhypertrophie)

Tier Nr.	Tiergew. bei Op. g	Tiergew. bei Töt. g	Herzgew. g	$\frac{\text{Herzgew. g}}{\text{Tiergew. kg}}$	Ventrikelgew. g	Druckampl. vor Op. mm Hg	Druckampl. nach Op. mm Hg	Druckampl. bei Töt. mm Hg
221	3400	3650	15,10	4,13	12,50	23	65	52
224	3050	3750	14,20	3,78	11,70	27	55	50
234	2540	3700	11,70	3,16	9,90	20	43	
235	3050	4320	12,20	2,82	10,57			48
237	3200	3550	10,03	2,82	8,71			33
238	4330	3600	9,75	2,70	8,43			46
245	3600	4310	12,04	2,79	10,71		33	46
248	3500	4300	16,17	3,71	13,99	19	33	65
249	3650	4800	15,31	3,19	12,55	19	29	37
	3370	3997	12,94	3,23	11,00	22	43	47

Aorteninsuffizienz, die ja unter gleichen Bedingungen gemessen wurde (siehe Methodik).

In Tabelle 2 sind die der Tabelle 1 entsprechenden Werte der 9 von uns untersuchten Tiere mit künstlich erzeugter Herzhypertrophie zusammengestellt. Zusätzlich erscheinen die Tiergewichte zur Zeit der Operation, also ungefähr 6 Monate vor Tötung der Tiere. Ebenso kommen die gemessenen Druckamplituden vor Verletzung der Aortenklappen, also der gesunden, noch normalen Tiere, und die Druckamplituden nach erfolgter Operation hinzu.

Aus Tabelle 2 sehen wir, dass alle Tiere bis auf 238 mehr oder weniger an Gewicht zunehmen, trotz des Operationsschocks und des Klappenfehlers. Alle Tiere, die zur Sektion kamen, zeigten äusserlich keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, auch 238.

Der Vergleich der Druckamplituden zeigt den Anstieg nach der Operation, mithin die Herzarbeitvermehrung. Die niedere Amplitude bei 237 muss auf eine vegetative Reaktion des Kreislaufs durch die Narkose zurückgeführt werden, denn wir konnten am Herzpräparat eine einwandfreie Klappeninsuffizienz nachweisen.

Der Vergleich der entsprechenden Werte aus Tabelle 1 und 2 zeigt eine einwandfreie Herzhypertrophie bei den aorteninsuffizienten Herzen. Dies kommt auch in dem Verhältnis Herzgewicht zu Tiergewicht deutlich zum Ausdruck.

Die Herzhypertrophie bewegt sich im Mittelwert an der von LINZBACH angegebenen kritischen Grenze bei 65 %iger Gewichtsvermehrung. Die Streuung um den Mittelwert ist nicht unerheblich, man müsste also bei den darüber hinaus hypertrophierten Herzen schon eine latente Coronarinsuffizienz mit ihren Folgen für den Herzmuskel vermuten. Abgesehen von der Fragwürdigkeit unseres ziemlich willkürlichen Mittelwertes, konnten wir dennoch keine Insuffizienzzeichen bei den verarbeiteten Herzen auffinden, sowohl makroskopisch, wie auch mikroskopisch. Es wurde an allen Herzen, auch den normalen, der vordere Papillarmuskel des linken Ventrikels im mikroskopischen Schnitt untersucht. Bei dieser Untersuchung ergab sich weiterhin, dass die Hypertrophie durch Dickenzunahme der einzelnen Fasern zustande kam. Die Anzahl der Kerne hat sich in der Messeinheit verringert, dafür sind sie aber grösser geworden als die der normalen Fasern.

In den Tabellen 3 und 4 wurden die Messwerte aus den Doppelanalysen mit ihren Mittelwerten in mg Phosphor pro 100 g Frischgewebe für den Gesamtphosphor (Ges.P), den anorganischen Phosphor (anorg.P), die Differenz zwi-

schen beiden - den Gesamtnukleinsäure-Phosphor (Ges. NS) - für den Desoxyribonukleinsäure-Phosphor (DNS), den Ribonukleinsäure-Phosphor (RNS) und für das Verhältnis von RNS zu DNS angegeben. Am Fusse der Tabellen 3 und 4 sind die Mittelwerte aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen angegeben.

Der Vergleich beider Tabellen zeigt, dass sich bei normalen Herzen und bei hypertrophen Herzen pro 100 g Frischgewebe für den Gesamtphosphor, den anorgansichen Phosphor also auch für den Gesamtnukleinsäure-Phosphor kein Unterschied ergibt. Doch zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei den hypertrophen Herzen im Sinne einer Verminderung der DNS und entsprechender Erhöhung der RNS in der Gewichtseinheit, dasselbe wird in der Relation von RNS zu DNS angedeutet.

Wir konnten den Unterschied statistisch sichern und mit Hilfe einer Diskriminanz-Analyse auf Grund der DNS- und RNS-Werte aus der Einzelmessung eine Trennung von hypertrophen Herzen und normalen Herzen vollziehen.

Setzen wir die gefundenen Mittelwerte für die RNS und DNS der Normalherzen als Normwerte gleich 100, so finden wir als entsprechende Werte bei den hypertrophen Herzen für die RNS = 105,2 und für die DNS = 79,3, d.h. bei einer Herzhypertrophie um 66,4 % (es wurden die Ventrikelgewichte zum Vergleich herangezogen) steigerte sich der RNS-Gehalt pro Gewichtseinheit um 5,2 % und der DNS-Gehalt verminderte sich um 20,7 %. Immerhin verminderte sich der DNS-Gehalt pro Gewichtseinheit nicht im gleichen Masse, wie sich das Herzgewicht vermehrte, dies wäre also beweisend für eine DNS-Vermehrung im Verlaufe einer Hypertrophie. Käme es zu keiner DNS-Vermehrung innerhalb des Herzens, müsste bei einer Hypertrophie von 66,4 % die DNS pro 100 g Frischgewebe sich nicht um 20,7 % vermindern sondern um 40 %, denn der gleiche Gehalt an DNS, der in den kleinen Herzen gefunden wurde, müsste noch in den grösseren zu finden sein.

Rechnen wir anders und setzen den Gehalt an RNS und DNS pro gesundes Herz = 100, so finden wir für unsere hypertrophierten Herzen eine RNS-Vermehrung von 76 % und eine DNS-Vermehrung um 30 % bei einer Gewichtszunahme von 66,4 %.

Tabelle 3 (Normaltiere)

Tier Nr.	Ges. P	M	anorg. P	M	DNS	M	RNS	M	RNS DNS	M	Ges. NS	M
1	30,60 33,20	31,90	2,95 2,70	2,83	7,60 7,60	7,60	20,05 22,90	21,48	2,70 3,02	2,86	27,65 30,50	29,07
2	35,76 34,96	35,36	3,26 3,03	3,15	9,58 8,10	8,84	22,95 23,83	23,39	2,39 2,94	2,66	32,50 31,93	32,21
3	32,93	32,93	2,86	2,86	6,95	6,95	23,12	23,12	3,33	3,33	30,07	30,07
4	35,09	35,09	1,76	1,76	8,44	8,44	25,08	25,08	3,04	3,04	33,33	33,33
5	36,61 38,71	37,66	2,81 2,60	2,70	8,45 9,01	8,73	25,37 27,10	26,23	3,01 3,01	3,01	33,80 36,11	34,95
6	34,51 34,03	34,27	1,42 1,78	1,60	8,30 8,28	8,29	24,79 23,97	24,38	2,98 2,89	2,93	33,09 32,25	32,67
7	43,90 43,90	43,90	1,94 1,98	1,96	10,05 10,10	10,07	31,91 31,82	31,87	3,18 3,14	3,16	41,96 41,92	41,94
8	41,90 41,80	41,85	1,84 1,89	1,86	9,40 9,00	9,20	30,66 30,91	30,78	3,26 3,43	3,35	40,06 39,91	39,98
9	36,20 36,07	36,13	1,91 2,53	2,22	8,16 7,93	8,04	26,13 25,60	25,87	3,19 3,29	3,21	34,29 33,54	33,31
10	32,95 33,47	33,21	1,03 1,32	1,17	8,31 8,22	8,26	23,61 23,95	23,78	2,96 2,91	2,93	31,92 33,15	32,03
11	36,88 36,09	36,48	0,89 1,02	0,96	9,58 9,58	9,58	26,41 25,49	25,95	2,76 2,66	2,71	35,99 35,07	35,53
12	39,75 36,32	38,03	0,41	0,41	10,84 10,16	10,50	28,50 25,75	27,13	2,63 2,54	2,58	39,34 35,91	37,62
		36,40		1,95	8,71		25,76	25,76		2,98		34,45

Tabelle 4 (Tiere mit Herzhypertrophie)

Tier Nr.	Ges. P	M	anorg. P	M	DNS	M	RNS	M	$\frac{RNS}{DNS}$	M	Ges. NS	M
221	29,52 32,00	30,76	1,92 1,78	1,85	5,36 6,14	5,75	22,24 24,08	23,16	4,16 3,92	4,04	27,60 30,22	28,91
224	32,00 32,03	32,01	0,98 0,96	0,97	6,07 6,73	6,40	24,95 24,35	24,65	4,11 3,52	3,82	31,02 31,07	31,04
234	33,14 31,32	32,23	2,09 1,83	1,96	7,06 6,50	6,78	23,99 22,99	23,49	3,40 3,54	3,47	31,05 29,49	30,27
235	32,62 34,15	33,43	1,33 1,90	1,61	5,31 5,17	5,24	25,99 27,08	26,53	4,91 5,24	5,07	31,29 32,25	31,77
237	42,53 42,31	42,42	1,88 1,87	1,87	8,02 8,05	8,03	32,63 32,39	32,51	4,07 4,05	4,06	40,65 40,44	40,54
238	46,74	46,74	3,24	3,24	7,34	7,34	36,16	36,16	4,93	4,93	43,50	43,50
245	34,35	34,35	1,32	1,32	6,81	6,81	26,22	26,22	3,85	3,85	33,03	33,03
248	36,28 36,68	36,48	1,91 1,72	1,81	7,11 7,65	7,38	27,26 27,31	27,28	3,83 3,53	3,68	34,37 34,96	34,66
249	35,02	35,02	1,24	1,24	7,53	7,53	26,25	26,25	3,48	3,48	33,78	33,78
		35,93		1,77		6,81		27,36		4,05		34,16

2. Statistische Analyse der Messergebnisse ^{+) ++)}

Als statistische Masszahlen zur Kennzeichnung der Stichproben-₂Verteilungen benutzten wir das arithmetische Mittel $\bar{x}$ und die Varianz s^2 der Messergebnisse (Tab. 5 und 6). Der statistischen Auswertung legten wir die Annahme zugrunde, die Stichproben seien aus Normalverteilungen entnommen und fassten die Stichproben-Parameter als Schätzwerte der entsprechenden Parameter der übergeordneten Verteilungen auf.

Zunächst prüften wir mittels Varianz-Analysen, ob sich die Verteilungen des Ges. P und des anorg. P in den beiden Tiergruppen unterscheiden. Ihre Durchführung war möglich, da für beide Merkmale die Varianzen der Verteilungen in den beiden Tiergruppen wesentlich gleich sind. Die Varianz-Analysen (Tab. 7 und 8) ergaben keine statistisch fassbaren Unterschiede zwischen den Mittelwerten des Ges. P und des anorg. P in den beiden Tiergruppen. Unter der Voraussetzung der Normalverteilung muss somit die Verteilung des Ges. P und anorg. P in den beiden Tiergruppen als wesentlich gleich angesehen werden.

Bei den DNS und den RNS prüften wir nach der Methode des verallgemeinerten Abstandes, ob zwischen beiden Tiergruppen Unterschiede in der gemeinsamen Verteilung dieser beiden Nukleinsäuren bestehen. Wir erhielten hierbei als verallgemeinerten Abstand ein $D^2 = 8^{\circ}0512$, dessen zugehörige Prüfgrösse $F_{emp} = 19^{\circ}61$, bei $n_1 = 2$ und $n_2 = 18$ Freiheitsgraden, eine Überschreitungs-Wahrscheinlichkeit von höchstens 0,1 % zukommt. In der gemeinsamen Verteilung der DNS und RNS liegt somit ein statistisch stark gesicherter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen vor.

Zur näheren Kennzeichnung dieses Unterschiedes errechneten wir eine lineare Diskriminanz-Funktion zur Trennung der Werte der beiden Tiergruppen. Jeder simultanen Bestimmung der DNS und der RNS an einem Versuchstier entspricht nach Wahl eines cartesischen Koordinatensystems ein Messpunkt in der Ebene. Abb. 1 gibt die von uns gefundenen Messpunkte beider Tiergruppen wieder. Die eingezeichnete Gerade, die sogenannte lineare Diskriminanz-Funktion, ist diejenige Gerade, welche die bestmögliche Trennung zwischen Messpunkten der beiden Tiergruppen vermittelt. Die Abb. zeigt deutlich, in welcher Weise sich die gemeinsamen Verteilungen der DNS und RNS in den beiden Tiergruppen unterscheiden und in welcher Form die

+) Durchgeführt von Herrn Dipl. math. K. LIEBRICH.

++) Zur Verfügung gestellt von Dr. H. NOWY.

Trennung der Messpunkte der beiden Tiergruppen durch die Diskriminanz-Funktion erfolgt.

Zur Errechnung der Diskriminanz-Funktion und des verallgemeinerten Abstandes wurden die von R. A. FISHER und P. C. MAHALANOBIS entwickelten Methoden verwendet (RAO 19., KENDALL 20.). Da die Varianzen der beiden Merkmale DNS und RNS und die Korrelation zwischen den beiden Merkmalen in den beiden Tiergruppen wesentlich gleich sind, waren die Voraussetzungen zur Anwendung dieser Methoden gegeben. Als gemeinsame Momenten-Matrix für beide Tiergruppen erhielten wir

$$M = \begin{pmatrix} 0^{\circ}9300 & 2^{\circ}1042 \\ 2^{\circ}1042 & 13^{\circ}1063 \end{pmatrix} \quad (19 \text{ Freiheitsgrade})$$

Hieraus errechnet sich als lineare Diskriminanz-Funktion

$$L(x, y) = 0^{\circ}9817 x - 0^{\circ}1905 y - C.$$

(x dient hierbei als Abkürzung der Messwerte der DNS, y als Abkürzung der Messwerte der RNS). Die Koeffizienten der Diskriminanz-Funktion wurden so normiert, dass sich nach einsetzen der Werte eines Messpunktes dessen gerichteter, orthogonaler Abstand von der Diskriminanz-Funktion ergibt. Positive Werte zeigen dabei an, dass der Messpunkt rechts von der Diskriminanz-Funktion, negative Werte, dass er links von ihr liegt.

Aus dem steilen Verlauf der Diskriminanz-Funktion (Steigungsverhältnis 5, 15) und der Lage der Messpunkte ergibt sich anschaulich, dass sich die Tiergruppen hauptsächlich hinsichtlich der DNS unterscheiden. Bei kaum verändertem mittlerem Wert der RNS zeigen die DNS der Normaltiere einen deutlich gesteigerten Wert gegenüber den kranken Tieren.

In der Tabelle 9 sind die für unsere Stichproben errechneten orthogonalen Abstände von der zugehörigen Diskriminanz-Funktion angegeben. Am Fusse der Tabelle finden sich die Mittelwerte $\bar{d}$ und die Varianzen s^2 der orthogonalen Abstände.

Die Konstante C bestimmten wir so, dass die Schwerpunkte der Verteilungen in den beiden Tiergruppen absolut den gleichen Abstand von der Diskriminanz-Funktion haben. ($C = 2^{\circ}5562$).

Ob damit eine optimale Trennung der beiden Gesamtheiten erzielt wird, kann bei dem kleinen Stichprobenumfang nicht entschieden werden.

Wird die Diskriminanz-Funktion dazu benutzt, um ein Tier aufgrund der Lage seiner Messpunkte einer der beiden Tiergruppen zuzuordnen, so hat die Zuordnung zur Gruppe der Normaltiere zu erfolgen, wenn sich für den Messpunkt ein positiver orthogonaler Abstand von der Diskriminanz-Funktion ergibt. Andernfalls ist das Tier als ein Tier mit Herzhypertrophie zu klassifizieren. (Vernachlässigt man die Stichproben-Fehler, so ergibt sich bei diesem Verfahren annähernd eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 9 % dafür, dass fälschlicherweise ein Tier mit Herzhypertrophie als normal klassifiziert wird).

Tabelle 5 (Normaltiere)

	N	$\bar{x}$	SAQ	s^2	s
Ges. P	12	36° 40	140° 08	12° 73	3° 56
Anorg. P	12	1° 95	7° 80	0° 70	0° 84
DNS	12	8° 71	11° 30	1° 02	1° 01
RNS	12	25° 76	101° 87	9° 26	0° 96

Tabelle 6 (Tiere mit Herzhypertrophie)

	N	$\bar{x}$	SAQ	s^2	s
Ges. P	9	35° 93	224° 89	28° 11	5° 30
Anorg. P	9	1° 77	3° 37	0° 42	0° 65
DNS	9	6° 81	6° 37	0° 79	0° 89
RNS	9	27° 36	147° 15	18° 39	4° 29

Tabelle 7

Varianz-Analyse zum Vergleich des Ges. P zwischen den Tiergruppen

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ
Innerhalb der Tiergruppen	19	364° 97	19° 21
Zwischen den Tiergruppen	1	1° 13	1° 13
Gesamt-Varianz	20	366° 10	18° 30

Tabelle 8

Varianz-Analyse zum Vergleich des Anorg.P zwischen den Tiergruppen

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ
Innerhalb der Tiergruppen	19	11° 17	0° 59
Zwischen den Tiergruppen	1	0° 18	0° 18
Gesamt-Varianz	20	11° 35	0° 57

Tabelle 9

Orthogonale Abstände von der Diskriminanz-Funktion bei der Trennung der Tiergruppen N (Normaltiere) und H (Tiere mit Herzhypertrophie).

Tier Nr.	Tiergruppe N	Tiergruppe H
1	0° 8128	- 1° 3234
2	1° 6662	- 0° 9691
3	- 0° 1377	- 0° 3751
4	0° 9516	- 2° 4661
5	1° 0172	- 0° 8683
6	0° 9377	- 2° 2390
7	1° 2583	- 0° 8657
8	0° 6118	- 0° 5081
9	0° 4084	- 0° 1646
10	1° 0225	
11	1° 9050	
12	2° 5833	
	$\bar{d} = 1° 0864$	$\bar{d} = - 1° 0864$

$$s^2 = 0° 5849$$

$$s^2 = 0° 7648$$

RNS mg P
pro 100 gr
Gewebe

Abbildung 1

33

32

31

30

29

28

27

26

25

24

23

22

21

20

5

6

7

8

9

10

11

DNS mg P pro 100 gr
Gewebe

16

○ Tiergruppe N

⊕ Tiergruppe H

— Lineare Diskriminanz-
Funktion zur Trennung
der Tiergruppe N und H



DISKUSSION

Wie können wir nun unsere Ergebnisse in das eingangs Ausgeführte einordnen?

Es war unser Ziel, gesunde Herzen gutartig hypertrophierten Herzen gegenüber zu stellen und zwar aufgrund ihres Gehaltes an Nukleinsäuren.

An der Gutartigkeit der Hypertrophie, im Sinne LINZBACH'scher Definition, ist bei den von uns untersuchten Herzen nicht zu zweifeln, nachdem selbst im mikroskopischen Schnitt kein gegenteiliger Befund erhoben werden konnte.

Wir fanden gleiche Gesamtnukleinsäurewerte pro Gewichtseinheit bei beiden Herzgruppen, trotz ziemlich ausgiebiger Hypertrophie. Dies deutet ein scheinbar ganz harmonisches Anwachsen auch des Nukleinsäuregehaltes der Zelle an. Für die Gesamtheit ihrer Einzelfraktionen trifft dies zu, doch werden diese aufgeschlüsselt, so zeigt die DNS eine Zunahme von nur 30 % und die RNS aber den Sollwert überschreitend eine Zunahme von 76 %, wenn wir nach dem Grad der Ventrikelgewichtszunahme den Sollwert bei 66 % festlegen.

Die DNS vermehrt sich, nun kennen wir keinen anderen Vermehrungsmechanismus für die DNS als den über eine mitotische Vervielfachung der Chromosomensätze, sei es nun im Bilde der echten Mitose mit Kern bzw. Zellteilung oder im Bilde der Endomitose. Mit unserer Methode lässt sich die Frage, ob Mitose oder Endomitose, nicht klären, da uns der exakte morphologische Nachweis, der sich zumindest für die Mitosen führen lässt, fehlt. Wenn wir aber die von den Pathologen an menschlichen hypertrophierten Herzen gemachten Erfahrungen zur Hilfe nehmen, die Mitosen scheinbar ausschliessen, Endomitosen jedoch in den Riesenkernen, die auch bei uns vorlagen, vermuten, so legen unsere Ergebnisse den Gedanken an Endomitosen nahe.

Die RNS vermehrt sich ebenfalls, sogar mehr als es der Hypertrophie entsprechen würde. Wir führen dies, in Anlehnung an das in der Einleitung Gesagte, auf die gesteigerte funktionelle Belastung der Zelle zurück, ja diese geradezu beweisend. Das Verhältnis von RNS zu DNS gibt einen guten Eindruck von der bei der Hypertrophie stattgehabten Verschiebung unter den Nukleinsäurefraktionen, sie wächst von nahezu 3,0 auf 4,0 sehr deutlich an, damit zeigend, dass sich die DNS relativ gegenüber der RNS vermindert hat. Die Regulation der Zelle eine Mehrbeanspruchung auszugleichen geht in erster Linie mit einer Vermehrung der RNS einher. Ob diese Verschiebung für die Hypertrophie geradezu charakteristisch ist, sei dahingestellt. Doch gelang es mit Hilfe einer Diskriminanzfunktion beide Herzgruppen voneinander zu trennen und zwar so dass

mit 91 %iger Treffsicherheit allein aus den Nukleinsäurewerten pro 100 g Frischgewebe eine Aussage getroffen werden kann in Bezug auf das Vorliegen einer Herzhypertrophie. Es ist fraglich ob wir in den DNS- und RNS-Werten ein sicheres Kriterium für das Vorliegen einer Hypertrophie haben, denn wir wissen nicht inwieweit hier andere Faktoren in den Nukleinsäurebestand eingreifen können.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden zwei Gruppen Kaninchenherzen, hypertrophe und normale, auf ihren Gehalt an Desoxyribonukleinsäure und auf ihren Gehalt an Ribonukleinsäure untersucht.

Es fand sich bei einer Herzhypertrophie um etwa 66 % eine Zunahme der Ribonukleinsäure um durchschnittlich 76 % und eine Zunahme der Desoxyribonukleinsäure um durchschnittlich 30 %.

Die Vermehrung der Desoxyribonukleinsäure legt die Vermutung nahe, dass sich in den Riesenzellen der hypertrophierten Herzen Endomitosen abgespielt haben.

Die Vermehrung der Ribonukleinsäure unterstützt die Auffassung anderer Untersucher, dass bei erhöhter Funktionsbeanspruchung der Zelle die Ribonukleinsäureproduktion ansteigt.

Es gelang mit Hilfe einer Diskriminanz-Funktion aufgrund des Ribonukleinsäure- und des Desoxyribonukleinsäure-Gehaltes der Herzen pro 100 g Frischgewebe beide Herzgruppen voneinander zu trennen, so dass allein mit den Ribonukleinsäure- und Desoxyribonukleinsäure-Werten eine Zuordnung zu einer jener Gruppen möglich wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALTMANN, H.W.: Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. II/;
465. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- 2) GRUNDMANN, E.: Verh. d. dsch. Ges. Path. 38 362. 1954
- 3) zit. nach BÜCHNER, F.:
Allgemeine Path. 27 München, Berlin, 1956
- 4) BUTENANDT, A.: Naturwissenschaften 40 91. 1953
- 5) FURST, S., ROLL, P.M. und BROWN, G.B.:
J. of Biol. Chem. 183 251-266. 1950
- 6) ALTMANN, H.W.: Klin. Wochenschr. 33 306. 1955
- 7) CASPERSON, T.O.: Naturwissenschaften 29 29. 1941
- 8) CASPERSON, T.O.: Naturwissenschaften 29 33. 1941
- 9) zit. nach WISS, O.: Physiologische Chemie Bd. II/Ib 909. Berlin,
Göttingen, Heidelberg. 1954
- 10) LINZBACH, A.J.: Klin. Wochenschr. 26 459. 1948
- 11) LINZBACH, A.J.: Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. VI/I
Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1955
- 12) NIETH, H.: Beitr. path. Anat. 110 618. 1949
- 13) DAVIDSON, I.N. and WAYMOUTH, C.:
The Biochem. J. 38 39. 1944
- 14) THOMSON, R.Y., HAGY, F.C., HUTCHISON, W.C. and DAVIDSON, I.N.:
The Biochem. J. 53 460. 1953
- 15) BANGA, I., KOKAS, E., MICZBAN, I., and TÖRÖ, I.:
Acta physiol. Budapest 7 401-407. 1955
- 16) SCHMIDT, G. and THANNHAUSER, S.J.:
J. of Biol. Chem. 161 83. 1945
- 17) FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.:
J. of Biol. Chem. 66 375. 1925

- 18) FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.:
J. of Biol. Chem. 81 629. 1929
- 19) DELORY, G.E.: The Biochem. J. 32 1161. 1938
- 20) RAO, C.R.: Advanced Statistical Methods in Biometric Research, New York, London 1952.
- 21) KENNDALL, M.G.: A course in Multivariate Analysis, London 1957.

Herrn Privatdozent Dr. med. H. NOWY bin ich zu grossem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas der Dissertation und für sein immer waches Interesse bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. med. H.D. FRINGS sei besonders gedankt für stete Hilfsbereitschaft und wertvolle Anregungen zu meiner Versuchsarbeit.

LEBENS LAUF

Am 6. Dezember 1933 wurde ich in Breslau als viertes Kind des Facharztes für Orthopädie Dr. med. Josef M. Rey und seiner Ehefrau Maria geb. Hoff geboren.

Nach sechsjährigem Besuch der Volksschule in Breslau und Reit im Winkl (Obb.) und nach achtjährigem Besuch des naturwissenschaftlichen Couven-gymnasiums in Aachen legte ich Ostern 1954 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1954 begann ich das medizinische Studium an der Universität Würzburg. Seit dem Sommersemester 1955 studierte ich ohne Unterbrechung an der Universität München. 1956 konnte ich hier die medizinische Vorprüfung ablegen. Im Wintersemester 1959 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen.

